

ЗАВИСИМАЯ ОТ iNOS МОДУЛЯЦИЯ ТОНУСА КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ, РАЗВИВАЮЩЕМСЯ НА ФОНЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ АДАПТАЦИИ

ЛАЗУКО С.С.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2020. – Том 19, №3. – С. 30-40.

iNOS-DEPENDENT MODULATION OF THE CORONARY VESSELS TONE IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS DEVELOPING ON THE BACKGROUND OF PRELIMINARY ADAPTATION

LAZUKO S.S.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2020;19(3):30-40.

Резюме.

Цель работы – оценить вклад индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в механизмы поддержания тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда у крыс при экспериментальном сахарном диабете, развивающемся на фоне периодически воспроизводимых эпизодов иммобилизации.

Материал и методы. Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда исследовали на препаратах сердец крыс, изолированных по методу Лангендорфа из организмов крыс, и перфузируемых в условиях постоянной объемной скорости коронарного потока (6, 8, 10 и 15 мл/мин) раствором Кребса-Хензеляйта стандартного состава. Блокаду iNOS осуществляли S-метилизотиомочевинной (S-MT, 10^{-6} М). Адаптацию проводили посредством иммобилизации животных в вертикальном положении в пластиковом пенале, заполненном водой ($t=23\pm 2^{\circ}\text{C}$) до уровня шеи, в течение 8 суток. Сахарный диабет у крыс моделировали с помощью однократного внутрибрюшинного введения стрептозоцина (50 мг/кг), разведенного в цитратном буфере (pH 4,5).

Концентрацию стабильных продуктов деградации NO ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), супероксиддисмутазы, каталазы, диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в гомогенате левого желудочка определяли спектрофотометрическим методом. Содержание индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз (eNOS), интерлейкина 1 β , С-реактивного белка в сыворотке крови экспериментальных животных определяли иммуноферментным методом.

Результаты. Сахарный диабет, воспроизводимый у крыс после предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями, не сопровождался изменениями коронарного перфузионного давления и развиваемого внутрижелудочкового давления. Добавление в перфузионный раствор S-MT приводило к повышению коронарного перфузионного давления, но не оказывало влияния на величины развиваемого внутрижелудочкового давления и скорость сокращения и расслабления миокарда (dp/dt). В группе «Адаптация+сахарный диабет» определялось увеличение концентрации iNOS, продуктов перекисного окисления липидов, на фоне снижения антиоксидантной активности и повышения содержания маркеров воспаления (ИЛ-1 β , С-реактивный белок) у экспериментальных животных.

Закключение. Сахарный диабет, воспроизводимый на фоне периодических эпизодов иммобилизации, сопровождается увеличением образования индуцибельной NO-синтазы, что в условиях дефицита eNOS, скорее всего, имеет приспособительное значение и необходимо для того, чтобы поддержать на должном уровне продукцию вазоактивного NO и предупредить возможную вазоконстрикцию, вызванную стойкой гипергликемией, активными формами кислорода и развивающимся системным воспалением.

Ключевые слова: индуцибельная NO-синтаза, сахарный диабет, адаптация короткими стрессорными воздействиями, тонус коронарных сосудов.

Abstract.

Objectives. To evaluate the contribution of inducible NO synthase (iNOS) to the mechanisms of maintaining coronary vascular tone and myocardial contractile function in rats with experimental diabetes mellitus, developing against the background of periodically reproduced episodes of immobilization.

Material and methods. Coronary vascular tone and myocardial contractile function were studied on preparations of rat hearts isolated by the Langendorff's method and perfused at constant volumetric coronary flow (6, 8, 10 and 15 ml/min) with a standard Krebs-Henseligh solution. The iNOS blockade was carried out by S-methylisothiourea (S-MT, 10^{-6} M). Adaptation was carried out by immobilization of animals in supine position in a plastic box filled with water ($t=23\pm 2^{\circ}\text{C}$) to the neck level during 8 days. Diabetes mellitus in rats was modelled by means of a single intraperitoneal injection of streptozocin (50 mg/kg) diluted in citrate buffer (pH 4.5).

The concentration of stable degradation products of NO ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), superoxide dismutase, catalase, diene conjugates and malondialdehyde in the left ventricular homogenate was determined by spectrophotometric method. The content of inducible and endothelial NO synthases (eNOS), interleukin 1β , C-reactive protein in the blood serum of experimental animals was determined by enzyme immunoassay.

Results. Diabetes mellitus, reproduced in rats after preliminary adaptation to short stressful effects, was not accompanied by changes in coronary perfusion pressure and developed intraventricular pressure. Introduction of S-MT to the perfusion solution led to an increase in coronary perfusion pressure, but did not affect the values of the developed intraventricular pressure and the rate of contraction and relaxation of the myocardium (dP/dt). In the «Adaptation + diabetes mellitus» group, an increase in the concentration of iNOS, lipid peroxidation products, was determined against the background of a decrease in antioxidant activity and an increase in the content of inflammatory markers (IL- 1β , C-reactive protein) in experimental animals.

Conclusions. Diabetes mellitus, reproduced against the background of periodic episodes of immobilization, is accompanied by an increase in the formation of inducible NO synthase, which under conditions of eNOS deficiency, most likely has adaptive value and is necessary in order to maintain adequate production of vasoactive NO and to prevent possible vasoconstriction caused by persistent hyperglycemia, active forms of oxygen and developing systemic inflammation.

Key words: *inducible NO synthase, diabetes mellitus, adaptation to short stress effects, coronary vascular tone.*

Экспертами Международной Федерации Диабета прогнозируется интенсивный рост заболеваемости сахарным диабетом. Ученые предполагают, что к 2040 году количество заболевших во всем мире достигнет критической отметки 642 млн. человек [1]. Сахарный диабет рассматривается как один из основных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и является важной проблемой здравоохранения во всем мире [1]. Хроническая гипергликемия способствует развитию окислительного стресса, сосудистого воспаления, гиперпродукции NO, продуцируемого индуцибельной NO-синтазой (iNOS), активации перекисного окисления липидов (ПОЛ), причем эти механизмы являются важными звеньями патогенеза сосудистых осложнений сахарного диабета. Достаточно ранними проявлениями таких сосудистых осложнений является дисфункция эндотелия кровеносных сосудов и нарушение функциональной активности калиевых каналов, расположенных в гладкомышечных клетках сосудов [2, 3]. Следствиями диабетических макро- и микроангиопатий являются сосудистые «катастрофы» или поражения

органов мишеней, и поэтому изучение способов профилактики диабетических макро- и микроангиопатий с помощью медикаментозных и немедикаментозных способов коррекции является актуальным.

С этой целью в экспериментальных исследованиях чаще всего используют модели предварительной адаптации, например, с помощью периодически воспроизводимых эпизодов иммобилизации. Так, было показано, что адаптация короткими, не повреждающими воздействиями предупреждает: нарушения сосудистого тонуса и тяжелую гипотензию при остром экспериментальном инфаркте миокарда [4]; постстрессорные увеличение коронарного потока, снижение индекса ауторегуляции, сократительной функции миокарда и эффективность коронарной перфузии у крыс [5]; постстрессорное снижение функциональной активности калиевых каналов, расположенных в гладкомышечных клетках коронарных сосудов [6]. Хорошо изучена роль эндотелиальной NO-синтазы при адаптации периодически воспроизводимыми эпизодами иммобилизации. Основными механизмами такой адаптации явля-

ются ограничение активации перекисного окисления липидов мембран [7] и ограничение гиперпродукции NO, продуцируемого eNOS, а также усиление его депонирования в эндотелии и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов [8], увеличение образования белков теплового шока [9], сохранение функции калиевых каналов [6]. В то же время, вопрос об iNOS-зависимых механизмах регуляции тонуса сосудов сердца при стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете, развивающемся на фоне предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями, не изучался.

Цель нашего исследования – оценить вклад индуцибельной NO-синтазы в механизмы поддержания тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда у крыс при экспериментальном сахарном диабете, развивающемся на фоне периодически воспроизводимых эпизодов иммобилизации.

Материал и методы

Исследование проводили на неимбредных белых крысах-самках (*Rattus Muridae*) массой 180-240 г, содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом и водно-солевом режиме. Эксперименты на животных проводились в соответствии с требованиями Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) и International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990). Протокол проведения экспериментов был утвержден Комиссией по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными ВГМУ.

Из экспериментальных животных были сформированы 4 группы по 8 крыс в каждой: 1-ая – контрольная группа животных – «Контроль»; 2-ая – животные, адаптированные короткими стрессорными воздействиями, – «Адаптация»; 3-я группа животных с экспериментальным стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом – «Сахарный диабет»; 4 – ая группа животных с экспериментальным сахарным диабетом, развивающимся на фоне предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями, – «Адаптация + сахарный диабет».

Экспериментальные модели. Адаптацию периодически воспроизводимыми эпизодами иммобилизации проводили в течение 8 дней. Каж-

дое животное фиксировали в специальных пенах, погружая их в воду температурой 22-23°C до уровня шеи (методика описана ранее) [10]. Через сутки животным имитировали сахарный диабет путем внутрибрюшинного введения инъекции стрептозоцина в дозе 50 мг/кг массы животного (методика описана ранее) [11].

Эксперименты на изолированных по методу Лангендорфа сердцах. Изменения коронарного перфузионного давления при объемной скорости коронарного потока (ОСКП), составлявшей 6, 8, 10 и 15 мл/мин, а также развиваемое давление в левом желудочке, скоростные и силовые показатели работы миокарда изучали на изолированном сердце, используя методику Лангендорфа (методика описана ранее) [11].

Для изучения роли оксида азота, продуцируемого индуцибельной NO-синтазой (iNOS) в механизмах регуляции тонуса коронарных сосудов, в перфузионный раствор добавляли высокоселективный блокатор iNOS S-метилизотиомочевину (S-MT, 10⁻⁶M, Sigma, USA).

Концентрацию индуцибельной и эндотелиальной (eNOS) NO-синтаз, C-реактивного белка (СРБ) и интерлейкина 1β (ИЛ-1β) в сыворотке крови определяли с использованием диагностических наборов по прилагаемым к ним инструкциям.

Концентрацию продуктов деградации оксида азота (NO₂⁻/NO₃⁻), продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид) и антиоксидантную активность (АОА) (супероксиддисмутаза и каталаза) определяли в гомогенатах левого желудочка по известным методикам, описанным ранее [12-14].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета статистических программ «STATISTICA 10.0» и «MS Excel». Тип распределения определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Достигнутый уровень значимости (p) при проверке гипотезы был меньше 0,05 (p<0,05). Полученное в ходе определения отклонение нулевой гипотезы указывало на то, что распределение отличалось от нормального. О достоверности различий между несвязанными выборками судили по критерию Манна-Уитни (U) и Уилкоксона (W). Величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25%; 75%]. Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости 5%.

Результаты

В группах животных со стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом и сахарным диабетом, развивающимся на фоне предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями, определялись изменения массы стресс-восприимчивых органов. Так, относительная масса надпочечников в группе животных «Сахарный диабет» и «Адаптация + сахарный диабет» увеличивалась на 70 и 20% (рис. 1А, Б)

соответственно, а селезенки – снижалась на 23 и 53%, соответственно (рис. 1 А, Б). В группе животных «Адаптация + сахарный диабет» относительная масса селезенки уменьшалась в меньшей степени, по сравнению с соответствующим показателем группы «Сахарный диабет» (рис 1Б). Относительная масса надпочечников у животных с сахарным диабетом, развивающимся на фоне адаптации к стрессу, увеличивалась в меньшей степени, чем в группе животных с экспериментальным сахарным диабетом (рис. 1А). Важно,

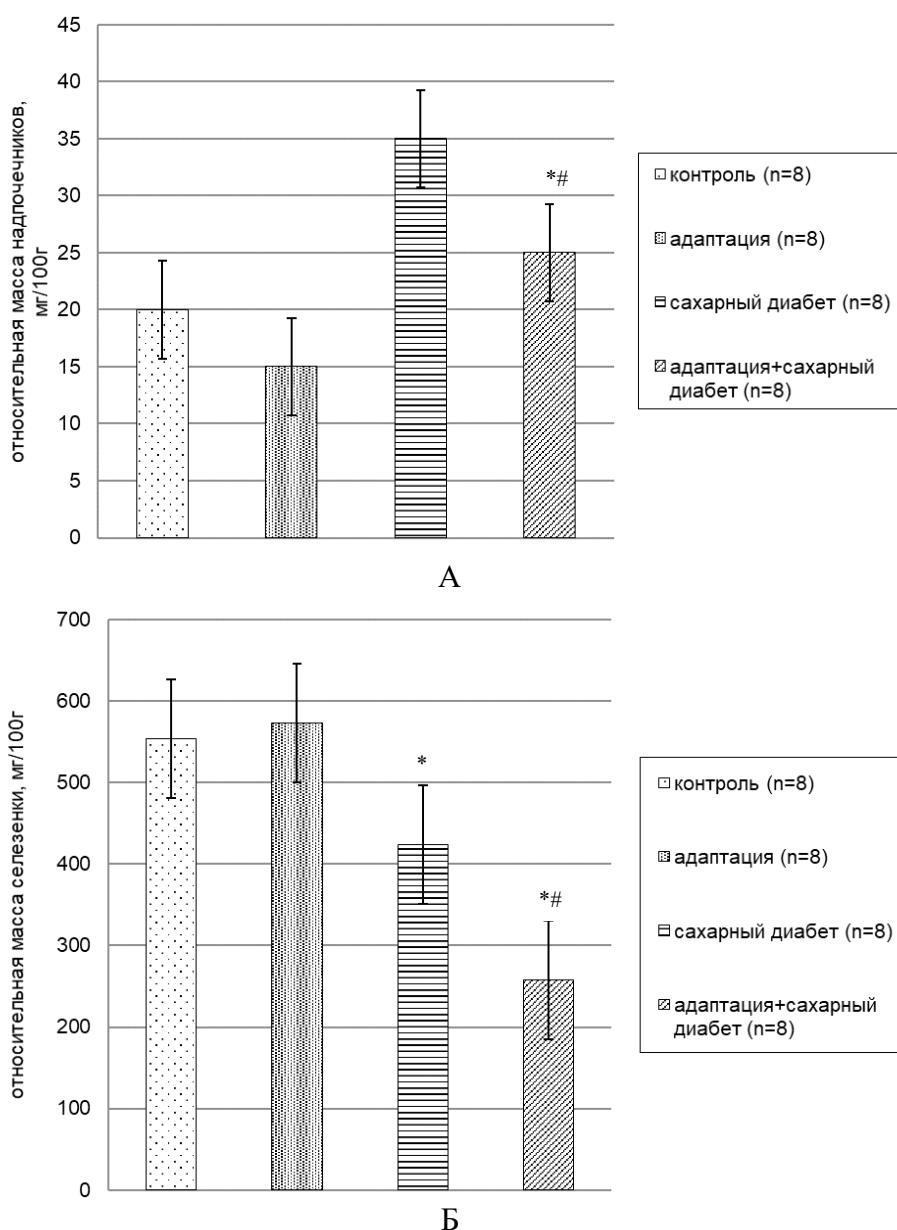


Рисунок 1 – Изменение относительной массы надпочечников (А) и селезенки (Б) после адаптации, стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета и сахарного диабета, развивающегося на фоне предварительной адаптации к стрессу: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ – по сравнению с группой «Сахарный диабет».

что относительная масса надпочечников и селезенки в группах «Адаптация» и «Контроль» не различались (для сравнения в контроле относительная масса надпочечников – 20,79 мг на 100 г массы тела животного; относительная масса селезенки – 553,75 мг на 100 г, рис. 1А, Б).

В крови животных групп «Адаптация + сахарный диабет» и «Сахарный диабет» отмечались повышение уровня глюкозы в крови (в группе контрольных животных уровень глюкозы составлял – $5,7 \pm 1,1$ ммоль/л), а также глюкозурия и кетонурия. В группе контрольных животных концентрация гликированного гемоглобина составила 2,6%. Стрептозоцин-индуцированный сахарный диабет, воспроизведенный на фоне адаптации, сопровождался повышением содержания гликированного гемоглобина до 5% (сравнение с контролем, $p=0,003$) и не отличался от показателей гликированного гемоглобина группы «Сахарный диабет», который составлял 5,4%. В указанных группах выявлялось снижение массы тела крыс в одинаковой степени в среднем на 19% (масса тела животных до эксперимента составляла в среднем $185 \pm 5,3$ грамма). Выживаемость животных с сахарным диабетом, воспроизведенным у крыс после предварительной адаптации к стрессу, составляла 100% (для сравнения, в группе животных только с экспериментальным сахарным диабетом выживаемость была равной 70%).

При экспериментальном сахарном диабете наблюдалось снижение коронарного перфузионного давления в среднем на 23% (рис. 2А) и развиваемого давления в левом желудочке в среднем на 26% ($p=0,0001$, сравнение с контролем), наряду со снижением скорости сокращения на 34% и расслабления левого желудочка в среднем на 29%, ($p=0,005$, сравнение с контролем) [11].

Подавление активности iNOS приводило к восстановлению величин КПД и развиваемого давления в левом желудочке до контрольных показателей в сердцах, изолированных из организмов крыс с сахарным диабетом (рис. 2Б). Однако в группе «Сахарный диабет» показатели скорости сокращения и расслабления миокарда все же оставались сниженными при всех уровнях ОСКП, по сравнению с контролем. Эти факты позволяют предположить, что одним из механизмов снижения тонуса сосудов сердца и его сократительной активности при экспериментальном сахарном диабете является значительное увеличение продукции оксида азота, продуцируемого iNOS.

Экспериментальный сахарный диабет сопровождался увеличением уровня диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в миокарде левого желудочка, на фоне снижения активности антиоксидантной системы, увеличением концентрации продуктов деградации монооксида азота в гомогенате левого желудочка, увеличением концентрации индуцибельной и снижении

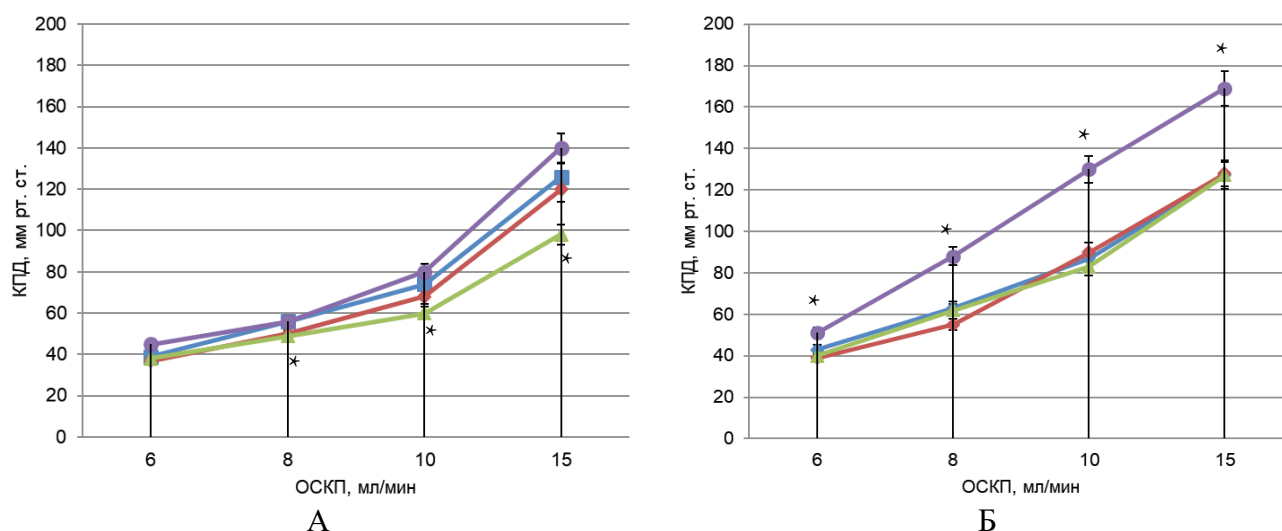


Рисунок 2 – Изменение коронарного перфузионного давления (КПД) после адаптации, стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета и сахарного диабета, развивающегося на фоне предварительной адаптации (А); на фоне блокады индуцибельной NO-синтазы (Б).

По оси абсцисс – коронарное перфузионное давление в мм рт. ст., по оси ординат – объемная скорость коронарного потока (ОСКП) в мл/мин; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ■ – группа «Контроль»;

▲ – «Сахарный диабет»; ◆ – «Адаптация»; ● – «Адаптация + сахарный диабет».

Таблица – Изменение концентрации индуцибельной (iNOS), эндотелиальной (eNOS) NO-синтаз, ИЛ-1 β , С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови; NO₂⁻/NO₃⁻, продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты (ДК); малоновый диальдегид (МДА) и антиоксидантной активности (супероксиддисмутаза (СОД); каталаза (КАТ) в гомогенате миокарда экспериментальных животных

Группы	Концентрация eNOS, пг/мл в сыворотке крови	Концентрация iNOS, нг/мл в сыворотке крови	Концентрация NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ мкМ в миокарде	Концентрация ДК, нМ/г липидов в миокарде	Концентрация МДА, нМ/г белка в миокарде	Концентрация СОД с учетом коэф. разведения в 41 раз ЕД/г миокарда	Концентрация КАТ мкМ /г миокарда	Концентрация СРБ, мг/л в сыворотке крови	Концентрация ИЛ-1 β , пг/мл в сыворотке крови
Контроль (n=10)	47,20 (41,6;63,3)	2,66 (2,39;2,93)	24,30 (23,0;24,5)	100,44 (76,0;128,1)	77,66 (74,3;93,1)	70,27 (66,2;77,8)	68,12 (37,7;80,9)	0,21 (0,07;0,23)	-
Сахарный диабет (n=10)	12,50 (10,6;14,8) p ₁ =0,003	10,10 (7,2;12,6) p ₁ =0,0004	43,06 (39,3;54,9) p ₁ =0,002	199,00 (180,3;274,7) p ₁ =0,003	128,57 (118,3;258,3) p ₁ =0,004	34,59 (29,5;39,4) p ₁ =0,0001	29,86 (28,9;33,8) p ₁ =0,0007	0,34 (0,25;0,37) p ₁ =0,003	31,46 (28,35;33,23) p ₁ =0,002
Адаптация (n=8)	92,20 (29,1;151,1) p=0,005	3,50 (3,2;3,7)	29,30 (27,2;30,5) p=0,003	115,40 (111,9;126,0)	97,45 (83,0;99,6)	90,40 (76,8;94,7) p=0,0001	80,5 (50,5;91,6) p=0,002	0,05 (0,04;0,06)	-
Адаптация + сахарный диабет (n=8)	19,10 (13,5;22,3) p ₁ =0,001 p ₃ =0,0002	21,51 (19,7;24,2) p ₁ =0,007 p ₂ =0,002 p ₃ =0,0003	33,25 (31,02;36,54) p ₁ =0,004 p ₂ =0,0006 p ₃ =0,0001	140,11 (136,8;148,3) p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0003 p ₃ =0,0002	264,01 (217,8;377,9) p ₁ =0,002 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,007	33,65 (28,5;40,4) p ₁ =0,003 p ₃ =0,0002	28,86 (27,9;32,8) p ₁ =0,0007 p ₃ =0,005	0,38 (0,34;0,41) p ₁ =0,004 p ₃ =0,0003	27,83 (26,7;30,43) p ₁ =0,003 p ₃ =0,006

Примечание: p₁ – по сравнению с группой «Контроль»; p₂ – по сравнению с группой «Сахарный диабет»; p₃ – по сравнению с группой «Адаптация»; n – количество животных в группе.

ем концентрации эндотелиальной NO-синтазы в сыворотке крови, а также появлением признаков системного воспаления низкой интенсивности (увеличение содержания С-реактивного белка и ИЛ-1 β в сыворотке экспериментальных животных, табл. 1).

В миокарде левого желудочка крыс группы «Адаптация» обнаруживались увеличение концентрации конечных продуктов деградации NO, а в сыворотке крови этих животных – увеличение концентрации эндотелиальной NO-синтазы и повышение активности антиоксидантной системы (табл. 1). В сыворотке крови крыс группы «Адаптация» маркеры воспаления (интерлейкин 1 β , С-реактивный белок в крови крыс) не определялись. В этой же группе животных тонус сосудов сердца (рис. 2А) и величины развиваемого левым желудочком давления не изменялись. Ингибирование активности индуцибельной NO-синтазы в группах контрольных и адаптированных к стрессу животных не сопровождалось изменениями как тонуса коронарных сосудов (рис. 2Б), так и сократительной функции сердца.

Сахарный диабет, воспроизведенный у крыс после предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями, не сопровождался изменениями коронарного перфузионного давления (рис. 2А) и развиваемого внутрижелудочкового давления. Значения перфузионного давления при всех уровнях ОСКП, развиваемое внутрижелудочковое давление и скорость сокращения и расслабления миокарда были сопоставимы с контрольными показателями.

Подавление активности iNOS в сердцах, изолированных из организмов животных группы «Адаптация + сахарный диабет», приводило к повышению коронарного перфузионного давления при значениях ОСКП 6, 8, 10 и 15 мл/мин на 32, 44, 71 и 30%, соответственно (рис. 2Б). В то же время, блокада iNOS не оказывала влияния на величины развиваемого давления в левом желудочке и показатели скорости сокращения и расслабления миокарда. Этот факт указывает на модулирующий вклад iNOS в регуляцию тонуса сосудов сердца группы животных «Адаптация + сахарный диабет».

В сыворотке крови животных с сахарным диабетом, воспроизведенным у крыс после предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями, наблюдался увеличенный уровень NO $_2^-$ /NO $_3^-$ на 37% и повышенное содержание продуктов ПОЛ, по сравнению с показате-

лями контрольных крыс (табл. 1). Концентрация супероксиддисмутазы и каталазы достоверно снижалась на 51 и 57% соответственно (табл. 1). Содержание СРБ в сыворотке крови животных с сахарным диабетом, воспроизведенным после предварительной адаптации, возрастала, превышая контрольный показатель в 2 раза (табл. 1). В группе животных «Адаптация + сахарный диабет» наблюдалось 5-кратное увеличение концентрации ИЛ-1 β в сыворотке крови, по сравнению с таковыми в контроле (табл. 1).

Обсуждение

Обнаруженное снижение миогенного тонуса коронарных сосудов и нарушение сократительной функции сердца в группе животных «Сахарный диабет» в значительной мере были обусловлены гиперпродукцией оксида азота индуцибельной NO-синтазой. Так, использование высокоселективного блокатора iNOS приводило к повышению ослабленного тонуса коронарных сосудов и увеличению сниженного внутрижелудочкового давления в группе животных «Сахарный диабет». Однако блокатор iNOS лишь частично восстанавливал скорость сокращения (+dP/dt) и расслабления (-dP/dt) миокарда. Продолжительная гипергликемия сопровождалась гиперпродукцией NO, продуцируемого iNOS, о чем свидетельствует существенное повышение концентрации продуктов деградации NO и увеличение концентрации iNOS в крови экспериментальных животных. Пусковым механизмом повышенного образования iNOS может быть как стойкая гипергликемия, так и обнаруженное увеличение концентрации маркеров воспаления низкой интенсивности – ИЛ-1 β и СРБ. Вероятно, в то же время повышается образование супероксидного радикала, о чем косвенно свидетельствует увеличение концентрации продуктов ПОЛ в миокарде животных группы «Сахарный диабет». Ранее Zhu M. и соавт. при инкубации культуры эндотелиоцитов, полученных из пупочной вены, в среде с высоким содержанием в ней глюкозы, доказали факт увеличения образования в этих клетках супероксидного радикала [15]. Высокие концентрации активных форм кислорода способны подавлять активность гена eNOS с последующим снижением содержания этого фермента в крови, что было обнаружено в нашем исследовании.

Адаптация короткими стрессорными воздействиями не оказывала влияния на тонус коронарных сосудов и сократительную функцию

миокарда как в условиях блокады iNOS, так и без нее. Ранее было показано, что адаптация периодически воспроизводимыми эпизодами иммобилизации сопровождалась увеличением активности iNOS и экспрессии гена, ответственного за синтез iNOS, но умеренным накоплением этого фермента в гладкомышечных клетках коронарных сосудов экспериментальных животных [10]. Этот факт был расценен нами как «подготовительный этап» сосудов сердца и миокарда к последующим неблагоприятным воздействиям, биологическая целесообразность которого заключается в ограничении возможной вазоконстрикции. Механизм регуляции образования iNOS в сосудах сердца крыс группы «Адаптация» представлен на рисунке 3.

При моделировании сахарного диабета на фоне предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями было установлено, что величины КПД и показатели РВД достоверно не отличались от таковых в контроле. Однако добавление в раствор для перфузии сердец, изолированных из организмов животных группы «Адаптация + сахарный диабет» высокоселективного блокатора iNOS S-метилизотиомочевина, сопро-

водилось увеличением тонуса коронарных сосудов при всех уровнях ОСКП, что свидетельствует о повышении продукции NO, образуемого iNOS, в клетках сосудов сердца. При этом обращает на себя внимание то, что значительное увеличение концентрации iNOS и снижение концентрации eNOS в сыворотке крови крыс группы «Адаптация + сахарный диабет» не сопровождалось столь массивной гиперпродукцией NO, о чем косвенно свидетельствует существенно меньший прирост концентрации нитратов/нитритов в гомогенате левого желудочка крыс группы «Адаптация + сахарный диабет» (сравнение с группой «Сахарный диабет»). В условиях моделирования сахарного диабета, на фоне предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями, могло развиваться т.н. «разобщение» субъединиц eNOS. «Разобщение» eNOS могло быть вызвано высокими концентрациями активных форм кислорода, о значительном повышении образования которых косвенно свидетельствует достоверно высокое содержание ДК и МДА в миокарде крыс группы «Адаптация + сахарный диабет» (сравнение с группой «Контроль» и «Адаптация»). Важно,



Рисунок 3 – Предположительный механизм регуляции образования iNOS и механизм регуляции тонуса сосудов сердца при адаптации короткими стрессорными воздействиями. Адаптация короткими стрессорными воздействиями сопровождается увеличением концентрации продуктов деградации монооксида азота (NO), продуцируемого эндотелиальной NO-синтазой (eNOS). Характерное для начальных стадий адаптации образование активных форм кислорода (АФК) и умеренное образование в этих условиях супероксидного аниона ($O_2^{\cdot-}$) при участии ядерного фактора транскрипции (NF-kB) способны активировать ген индуцибельной NO-синтазы (iNOS). При этом увеличенная продукция NO по механизму отрицательной обратной связи ингибирует NF-kB [16], тем самым регулируя образование фермента iNOS. Кроме того, при умеренной продукции супероксидного радикала при участии ядерного фактора NF-kB активируются гены супероксиддисмутазы (СОД), циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), белков теплового шока (HSP70) и других продуктов, способных регулировать редокс-состояние клеток, тем самым изменяя фенотипические свойства клеток кровеносных сосудов и миокарда, способствуя кардио- и вазопротекции.

что, несмотря на повышение содержания iNOS в крови крыс «Адаптация + сахарный диабет», тонус коронарных сосудов не отличался от таковых в контроле. Кроме того, при сахарном диабете, развивающемся на фоне предшествующих периодических эпизодов иммобилизации, по-видимому, стимулируемая провоспалительными цитокинами активация гена iNOS в этих условиях сочеталась и с повышением образования вазоконстрикторов (эндотелина-1, ангиотензина II) в клетках сосудов сердца [17], а также с нарушением механизмов регуляции гомеостаза ионизированного кальция в сосудистых гладкомышечных клетках. Преобладание последних двух механизмов вполне способно привести к коронарному спазму. Поэтому становится очевидным важная роль монооксида азота, синтезируемого индуцибельной NO-синтазой, образование которой необходимо для поддержания на должном уровне продукции вазоактивного NO, обеспечить которую только эндотелиальная NO-синтаза в данных условиях

уже не способна. Предположительный механизм iNOS-зависимой регуляции тонуса сосудов сердца крыс группы «Адаптация + сахарный диабет» представлен на рисунке 4.

Заключение

Сахарный диабет, воспроизводимый на фоне периодических эпизодов иммобилизации, сопровождается увеличением образования индуцибельной NO-синтазы, что в условиях дефицита eNOS, скорее всего, имеет приспособительное значение и необходимо для того, чтобы поддерживать на должном уровне продукцию вазоактивного NO и предупредить возможную вазоконстрикцию, вызванную стойкой гипергликемией, активными формами кислорода и развивающимся системным воспалением.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке ГПНИ, Беларусь, по заданию 1.2.49.

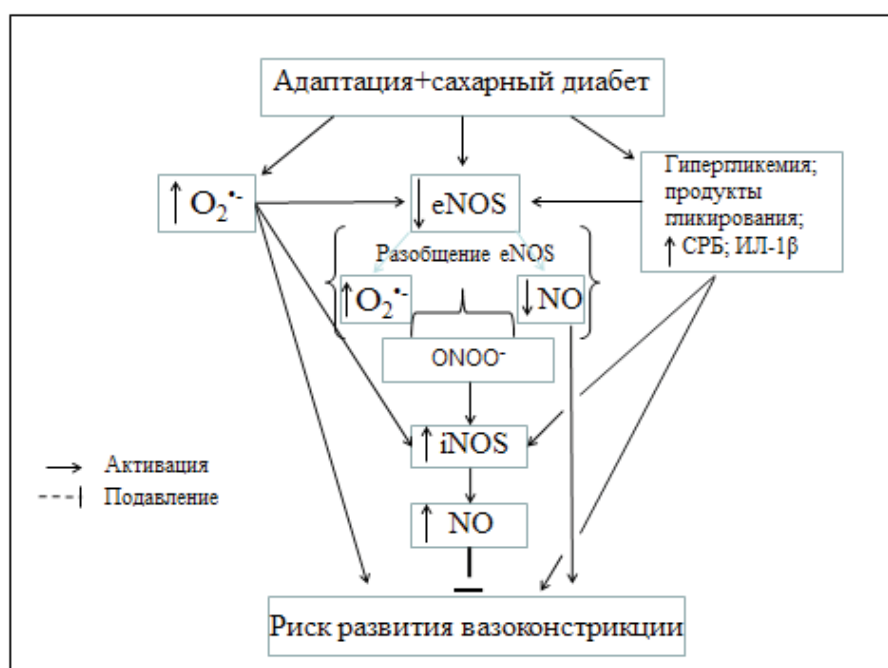


Рисунок 4 – Предположительный NO-зависимый механизм регуляции тонуса сосудов сердца при сахарном диабете, развивающемся на фоне предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями.

Экспериментальный сахарный диабет, развивающийся на фоне предварительной адаптации короткими стрессорными воздействиями, сопровождается стойкой гипергликемией, образованием продуктов гликирования, увеличенной концентрацией маркеров воспаления (интерлейкин-1β (ИЛ-1β), С-реактивный белок (СРБ)), активацией продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и снижением концентрации монооксида азота (NO), продуцируемого эндотелиальной NO-синтазой (eNOS). «Разобщенная» eNOS, наряду с монооксидом азота, может продуцировать супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$) или пероксинитрит ($ONOO^{\cdot-}$).

Перечисленные факторы стимулируют индуцибельную NO-синтазу (iNOS). Гиперпродукция NO, продуцируемого iNOS, способна ограничивать вазоконстрикцию, вызванную дефицитом NO, образуемого eNOS и образованием в эндотелиоцитах эндотелина-1.

Financing: The research was conducted within the frames of task 1.2.49 of State Research Programs (GPNI) of the Republic of Belarus.

Литература

1. Diabetes and cardiovascular disease / International Diabetes Federation. – Brussels, Belgium : International Diabetes Federation, 2016. – 14 p.
2. Downregulation of BK channel function and protein expression in coronary arteriolar smooth muscle cells of type 2 diabetic patients / T. Lu [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2019 Jan. – Vol. 115, N 1. – С. 145–153.
3. TRAF6 mediates high glucose-induced endothelial dysfunction / R. Liu [et al.] // *Exp. Cell. Res.* – 2018 Sep. – Vol. 370, N 2. – P. 490–497.
4. Meerson, F. Z. Adaptation to short-term stress prevents post-infarction hyperactivation of the endothelium and decrease in blood pressure in rats / F. Z. Meerson, E. B. Manukhina, A. V. Lapshin // *Biomed. Sci.* – 1991. – Vol. 2, N 6. – P. 623–628.
5. Божко, А. П. Предупреждение стрессорных изменений коронарного кровотока при помощи бета-блокатора обзидана, антиоксиданта ионола и адаптации животных к коротким стрессорным воздействиям / А. П. Божко, А. П. Солодков // *Изв. АН БССР. Сер. биол. наук.* – 1989. – № 5. – С. 611–617.
6. Солодков, А. П. Адаптация к коротким стрессорным воздействиям предупреждает постстрессорное нарушение функциональной активности кальцийактивируемых калиевых каналов коронарных сосудов / А. П. Солодков, С. С. Майорова, С. С. Лазуко // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* – 2010. – Т. 149, № 4. – С. 372–378.
7. Меерсон, Ф. З. Постстрессорная активация синтеза нуклеиновых кислот и белков и ее роль в адаптационных реакциях организма / Ф. З. Меерсон, В. И. Павлова, Г. Т. Сухих // *Патол. физиология и эксперим. терапия.* – 1982. – № 5. – С. 3–17.
8. Депо оксида азота (NO) и его адаптивная роль в сердечно-сосудистой системе / Е. Б. Манухина [и др.] // *Пато-*

- генез. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 19–27.
9. Heat Shock Proteins: Protection and Potential Biomarkers for Ischemic Injury of Cardiomyocytes After Surgery / V. A. Santos-Junior [et al.] // *Braz. J. Cardiovasc. Surg.* – 2018 May-Jun. – Vol. 33, N 3. – P. 291–302.
10. Лазуко, С. С. Модулирующее влияние iNOS на функциональную активность КАТФ-каналов коронарных сосудов у крыс, адаптированных к стрессу / С. С. Лазуко, Л. Е. Беляева, Е. Б. Манухина // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* – 2016. – Т. 102, № 7. – С. 864–875.
11. Лазуко, С. С. Особая роль индуцированной NO-синтазы в механизмах регуляции тонуса коронарных сосудов крыс при иммобилизационном стрессе, развивающемся на фоне сахарного диабета / С. С. Лазуко, Л. Е. Беляева, А. П. Солодков // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* – 2014. – Т. 100, № 4. – С. 433–444.
12. Гаврилов, В. Б. Измерение дисновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара // *Лаб. дело.* – 1988. – № 2. – С. 60–64.
13. Андреева, Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте тиобарбитуровой кислоты / Л. И. Андреева, В. А. Кожемякин // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 41–43.
14. Стальной, М. Д. Метод определения малонового альдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / М. Д. Стальной, Т. Г. Гаришвили // *Современные методы в биохимии* / под ред. В. Н. Ореховича. – Москва : Медицина, 1977. – С. 66–68.
15. Propofol protects against high glucose-induced endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells / M. Zhu [et al.] // *Anesth Analg.* – 2012 Feb. – Vol. 114, N 2. – P. 303–309.
16. Biphasic regulation of NF- κ B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide / L. Connelly [et al.] // *Immunol.* – 2001 Mar. – Vol. 166, N 6. – P. 3873–3881.
17. Schinzari, F. Increased endothelin-1-mediated vasoconstrictor tone in human obesity: effects of gut hormones / F. Schinzari, M. Tesaro, C. Cardillo // *Physiol. Res.* – 2018 Jun. – Vol. 67, suppl. 1. – P. S69–S81.

Поступила 25.03.2020 г.

Принята в печать 01.06.2020 г.

References

1. International Diabetes Federation. Diabetes and cardiovascular disease. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2016. 14 p.
2. Lu T, Chai Q, Jiao G, Wang X-L, Sun X, Furuseth JD, et al. Downregulation of BK channel function and protein expression in coronary arteriolar smooth muscle cells of type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Res.* 2019 Jan1;115(1):145–153. doi: 10.1093/cvr/cvy137
3. Liu R, Shen H, Wang T, Ma J, Yuan M, Huang J, et al. TRAF6 mediates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Exp Cell Res.* 2018 Sep;370(2):490–497. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.07.014
4. Meerson FZ, Manukhina EB, Lapshin AV. Adaptation to short-term stress prevents post-infarction hyperactivation

- of the endothelium and decrease in blood pressure in rats. *Biomed Sci.* 1991;2(6):623–8.
5. Bozhko AP, Solodkov AP. Prevention of stress changes in coronary blood flow with the help of beta-blocker obzidan, ionol antioxidant and adaptation of animals to short stressful effects. *Izv AN BSSR Ser Biol Nauk.* 1989;(5):611–7. (In Russ.)
6. Solodkov AP, Mayorova SS, Lazuko SS. Adaptation to short stressful effects prevents post-stress disturbance of the functional activity of calcium-activated potassium channels of the coronary vessels. *Biul Eksperim Biologii Meditsiny.* 201;149(4):372–8. (In Russ.)
7. Meerson FZ, Pavlova VI, Sukhikh GT. Post-stress activation of the synthesis of nucleic acids and proteins and its role in the adaptive reactions of the body. *Patol Fiziologii Eksperim Terapii.* 1982;(5):3–17. (In Russ.)

8. Манухина ЕБ, Дауни ГФ, Маллет РТ, Малышев ИЮ, Ванин АФ. Депо оксида азота (NO) и его адаптивная роль в сердечно-сосудистой системе. Патогенез. 2012;10(2):19-27. (In Russ.)
9. Santos-Junior VA, Lollo PCB, Cantero MA, Moura CS, Amaya-Farfan J, Morato PN. Heat Shock Proteins: Protection and Potential Biomarkers for Ischemic Injury of Cardiomyocytes After Surgery. Braz J Cardiovasc Surg. 2018 May-Jun;33(3):291-302. doi: 10.21470/1678-9741-2017-0169
10. Lazuko SS, Belyaeva LE, Manukhina EB. The modulating effect of iNOS on the functional activity of KATF channels of coronary vessels in rats adapted to stress. Ros Fiziol Zhurn im IM Sechenova. 2016;102(7):864-75. (In Russ.)
11. Lazuko SS, Belyaeva LE, Solodkov AP. A special role of induced NO synthase in the mechanisms of regulation of rat coronary vascular tone during immobilization stress developing against the background of diabetes mellitus. Ros Fiziol Zhurn im IM Sechenova. 2014;100(4):433-44. (In Russ.)
12. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of plasma diene conjugates by ultraviolet absorption of heptane and isopropyl extracts. Lab Delo. 1988;(2):60-4. (In Russ.)
13. Andreeva LI, Kozhemyakin VA. Modification of the method for determining lipid peroxides in the thiobarbituric acid test. Lab Delo. 1988;(1):41-3. (In Russ.)
14. Stal'noy MD, Garishvili TG. Method for determination of malonic aldehyde using thiobarbituric acid. V: Orekhovich VN, red. Sovremennye metody v biokhimii. Moscow, RF: Meditsina; 1977. P. 66-8. (In Russ.)
15. Zhu M, Chen J, Tan Z, Wang J. Propofol protects against high glucose-induced endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. Anesth Analg. 2012 Feb;114(2):303-9. doi: 10.1213/ANE.0b013e31823f0c42
16. Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs A. Biphasic regulation of NF-κB activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxid. Immunol. 2001 Mar;166(6):3873-81. doi: 10.4049/jimmunol.166.6.3873
17. Schinzari F, Tesaro M, Cardillo C. Increased endothelin-1-mediated vasoconstrictor tone in human obesity: effects of gut hormones. Physiol Res. 2018 Jun;67(Suppl 1):S69-S81. doi: 10.33549/physiolres.933821

Submitted 25.03.2020

Accepted 01.06.2020

Сведения об авторах:

Лазуко С.С. – к.б.н., доцент, заведующая кафедрой нормальной физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Lazuko S.S. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, head of the Chair of Normal Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра нормальной физиологии. E-mail: Lazuko71@mail.ru – Лазуко Светлана Степановна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Normal Physiology. E-mail: Lazuko71@mail.ru – Svetlana S. Lazuko.